

①⑨ 日本国特許庁 (JP)

①① 特許出願公開

①② 公開特許公報 (A)

昭59—116223

| ⑤⑤ Int. Cl. ³ | 識別記号 | 庁内整理番号 |
|--------------------------|------|------------|
| A 61 K 35/14 | | 7138—4 C |
| A 23 J 1/00 | | 7915—4 B |
| 1/20 | | 7915—4 B |
| A 61 K 37/04 | | 7138—4 C |
| 39/395 | | 7043—4 C |
| B 01 D 13/00 | | Z 7305—4 D |
| 31/00 | | |
| C 07 G 7/00 | | 6956—4 H |
| C 12 F 3/00 | | 7822—4 B |

④③ 公開 昭和59年(1984)7月5日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑤④ 膜によるタンパク質混合物の分画分離の方法

ム・ブレッケンハイマー・シュ
トラーセ71

⑦特 願 昭58—232611

⑦出 願 人 ショット、グラスヴェルケ

⑦出 願 昭58(1983)12月9日

ドイツ連邦共和国6500マインツ
・ハッテンベルクシュトラーセ
10

優先権主張 ③1982年12月9日③西ドイツ
(DE)④P3245591.7

⑦発 明 者 ローランド・シェナベル

⑦代 理 人 弁理士 八田幹雄

ドイツ連邦共和国6238ホフハイ

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

膜によるタンパク質混合物の分画分離の方法

2. 特許請求の範囲

(1) 分離されるべきタンパク質混合物を少なくとも10倍まで希釈させ、この希釈タンパク質混合物を少なくとも70%濾過率で高分子量物質を分離する第1膜濾過段階に導入し、この濾液を少なくとも70%の濾過率で希釈媒体を分離し低分子物質を濃縮する第2膜濾過段階に通すことを特徴とする膜によるタンパク質混合物の分画分離方法。

(2) 希釈液が20倍希釈液である特許請求の範囲第1項に記載の方法。

(3) タンパク質混合物の希釈液を用いることなしに60%以下の濾過率で非溶解成分を分離する前処理段階が挿入されている特許請求の範囲第1～2項に記載の方法。

(4) 希釈媒体が、時間あるいは分離希釈媒体の量の点であらかじめ決められた間隔で膜を通して

逆洗浄されるものである特許請求の範囲第1～3項に記載の方法。

(5) 段階的分離が圧力調節法により行なわれるものである特許請求の範囲第1～4項に記載の方法。

(6) 段階的分離が容積調節法により行なわれるものである特許請求の範囲第1～4項に記載の方法。

(7) 逆洗浄が圧力調節法により行なわれるものである特許請求の範囲第4～6項に記載の方法。

(8) 逆洗浄が容積調節法により行なわれるものである特許請求の範囲第4～6項に記載の方法。

(9) 分画膜血漿粉出法に用いられるものである特許請求の範囲第1～8項に記載の方法。

(10) タンパク質混合物が発酵液である特許請求の範囲第1～8項に記載の方法。

(11) 膜がガラス膜である特許請求の範囲第1～10項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

1. 発明の背景

技術分野

本発明は、膜によるタンパク質混合物の分離分画の方法に関するものである。

先行技術

製糖、濃縮および特定の物質の回収の目的で、異なる物質の混合物の種々の分離方法が、工業的製法、工学、生物工学および医療技術において用いられている。このような方法の例としては、抽出、蒸留、凍結乾燥、沈澱およびクロマトグラフ分離などのようなよく知られた方法がある。医療技術、特に血液学においては、遠心分離法が、血漿から固形の血液成分を分離するのに用いられてきたが、この方法は一般的に血漿搬出法(plasmapheresis)と呼ばれ、1959年に、ジェイ・エル・テューリス(J. L. Tullis)、ディー・エム・サージェナー(D. M. Surgenor)、アール・ジェイ・ティンク(R. J. Tinch)、エム・ディホント(M. D. Hont)の「ニュー・プリンシプル・オブ・クローズド・システム・セントリフュージーション(New Principle of

Closed System Centrifugation)」[Science 24, 792, (1956)]により明らかにされたものである。10年経過以内に、血漿搬出法は膜分離法により医療技術ならびに生物工学において補なわれた。膜分離は、しばしば非常に感受的な懸濁粒の分離に関する非分裂法を与える。医療技術において該方法は膜血漿搬出法(membrane plasmapheresis)と、生物工学においては、クロス・フロー・マイクロ濾過(cross-flow-microfiltration)とそれぞれ呼ばれている[エー・エス・ミカエリス(A. S. Michaelis)のDesalination 35, 329, (1980)]。

血漿搬出法は当分野において格別の進歩をもたらし、限外濾過および血液濾過による物質のある種類の濃縮が知られている[アール・シェナベル(R. Schnabel)、Fett-Seifen-Anstrichmittel 81 Nr. 2, 83 (1979)]が、ある物質の混合物の分離および選択分離の双方を達成するには今月までのところ至っていない。選択性の問題は、第2膜の形成によるあるいは膜

と分離されている物質との相互作用によるいわゆる濃縮分極効果のゆえ非常に重要であり、孔隙径のために期待される分離数値値が変換される[エッチ・ケミエル(H. Chemiel)のTherapeutic Plasma Exchange, エッチ・ジェイ・ガーランド(H. J. Garland)、フィ・ヘインゼ(V. Heinze)およびエッチ・エー・リー(H. A. Lee)編集、Springer, 15, (1981)]。ケミエルの論文は医学的血漿搬出法に関する560の引用例を掲げている。カスケード濾過法(cascade filtration)、分画膜血漿搬出法(fractional membrane plasmapheresis)および特殊膜血漿搬出法(specific membrane plasmapheresis)による異なる分子量の成分の分離が論議されている。エッチ・ストラスマン(H. S. Strassmann)のChemie Technik 11 Nr. 7, 813, (1982)を参照のこと。マイクロ濾過膜、限外濾過膜および超濾過膜(hyperfiltration membrane)に関連させて、比較的低分子量の物質から高分子を分離することが可能である。

このような濾過方法に適した空洞ガラス毛管膜が西独特許法第2454111号に述べられており、血液の透析濾過(diafiltration)に関するこれらの膜の使用が西独特許法第2757673号に述べられている。述べられた装置において異なる膜の組み合わせの使用がエッチ・ジー・シェバース(H. G. Sieberth)の「プラスマ・エクスチェンジ・シンポジウムバンド(Plasma Exchange Symposiumband)」[エッチ・ジー・シェバース編集、Schattauer Verlag 29, (1980)]に述べられている。しかしながら、試験された形体におけるこれらに述べられた装置は実用的でないものとして示されていた。それはいくつかの重要な点において十分満足できないものである。第1に、生体内における膜は試験管内において測定された評価と比較して総合的に異なる態様を示した。第2に、アルブミン回収は、アルブミンが交替されなければならず、また電解質溶液(濾液)が血漿のタンパク質濃度定数を保持するように血漿に加えなければならないために、非

常に低かった。ジェイ・タケダ(J. Takeda)、ワイ・オノ(Y. Ono)、ケイ・ヤギタ(K. Yagita)、ワイ・スマ(Y. Suma)、ケイ・カトカ(K. Katoka)のArtificial Organs, Vol. 5 (Suppl.) 168, (1981)はこの交替をダイリューション(dilution)と称する。しかしながら、このダイリューションはせいぜい3倍の希釈でしかない。

それ自体が技術的に楽観的である膜での低分子物質の不十分な希釈は、40%までの濾過率が用いられるという結果となる。これらの物質が膜によってあるいは膜状に形成される第2層によって保持されるとすると、全く低い回収率にしか到達できない。

Ⅱ. 発明の目的

膜により血液、乳、発酵液などのようなタンパク質混合物の分離のための改善された方法を提供することが一つの目的である。

本発明の他の目的は、60%以上の低分子物質の回収率と一方同時に液状混合物中の高分子物質

の完全な分離を達成するための連続的な方法での操作に適する方法を提供することにある。

これらの諸目的は、分離されるべきタンパク質混合物を少なくとも10倍まで希釈させ、この希釈タンパク質混合物を少なくとも70%の濾過率で高分子量物質を分離する第1膜濾過段階に導入し、この濾液を少なくとも70%の濾過率で希釈媒体を分離し低分子量物質を濃縮する第2膜濾過段階に通すことを特徴とする膜によるタンパク質混合物の分画分離により達成される。

驚くべきことに、分離される液状混合物が少なくとも10倍、好ましくは20倍に希釈されると、70%以上の濾過率が達成できることが見出された。このような希釈液においては、本質的に第2層は形成されず、単一種の溶液での体内中で得られる膜の分離数値[阻止特性(cut-off characteristics)]は本質的に不変である。該希釈溶液はまた、時間に関してあるいは分離希釈媒体の量に関して本質的に一定であるように膜の態様を達成するための膜の逆洗浄に用いることができ

る。血漿分離膜の高い濾過能は、ヒトタンパク質の60%以上の再循環を可能とし、異質タンパク質の添加を何ら必要としないという結果を導く。

Ⅲ. 発明の具体的説明

本発明の全般にわたる方法は、次の実施例にて説明する。本方法の個々の段階を別個に特別の適用に用いられることは本発明の範囲内である。本発明は物質平衡を含む方法を概略的に示す第1図でさらに図解される。

本方法は次の段階により構成される。

I. コロイド状に溶解あるいは懸濁している微粒子成分の分離(前処理段階)。

Ⅱ. 第1段階で得られた溶液の少なくとも10倍希釈。

Ⅲ. 高分子成分の濃縮あるいは70パーセントより高い濾過率での希釈媒体の低分子成分を伴う分離。

Ⅳ. もどすための成分の濃縮あるいは電解質を含む希釈媒体の分離あるいは第Ⅰ段階へもどすための物質より小さい大きさへの分子低下。

なお、第Ⅰ段階(前処理段階)は、分離されるべきタンパク質混合物の種類により必要に応じて押入されるものである。

本発明のさら進めた局面によると、分離される混合物のさらに進めた分画を達成するため第Ⅳ段階のあとに付加段階を編込むことができる。

使用されたフィルターの膜設計は、分離される分子の種類の大きさに依存する。膜の細孔サイズは、流通孔路において次々と大きいものから小さいものへと減少していく。正しい細孔サイズの選択は本質的に達成される最適な分離のためである。

第1図は血液の膜カスケード血漿搬出法(membrane cascade plasmapheresis)を図解する。

なお、第1図中の数値は、物質収支を表わす。処理の間、血液は40ml/分の速度で患者から採取される。ここに示された血液回収の速度はほんの一例であり、これは高くも低くもできる。

一般的に、血液には約40%の微粒子成分と約60%の血漿で構成される。血漿の全容積の約40%は、1:20に希釈された後に、第1フィル

ター（血漿分離器）1から第2フィルター2へ通過する。第2フィルター2において、高分子タンパク質は一定容積で、95%の透過率で濃縮される。そのタンパク質は膜細孔径により決められる截留値による分離截留値（阻止特性）以上のすべての微粒子を含む。示された実施例においては、これは150,000分子量以上の分子を含む（この分画はグロブリン分画と呼ばれる。）、患者の病気の症状に応じて、この分画は放棄することまたは希釈と分離を繰り返してさらに分離することも可能である。第Ⅱ段階の限外濾過液は、この特殊な場合においては血液濾過膜である次の膜3へ通される。この第Ⅳ段階分離では希釈サイクル（第Ⅱ段階）へ限外濾過液がもどされる間に、60,000以上の分子量部分が一定容積で高い透過率で濃縮される。ヒトアルブミンおよび凝固因子の大部分を含む60,000から150,000ダルトンの間の分画物は第Ⅰ段階の濃縮物と共に患者7にもどさる。実施例の物質収支は、この過程が一定容積で作動していることおよび、電

解質溶液の少部分の以外は何ら異種の物質を患者にもどさないことを示している。変更可能な本実施例のために選ばれた条件下で、2～3時間の処理は、血液の6～7リットルを濾過するのに充分である。

分画の経過中、一定容積は液体のあらかじめ決められた量の添加と濾過液のあらかじめ決められた量の除去により達成される。系内の圧力は膜抵抗の増大のため増加するが、前もって決められた最大圧力（ここに図解された実施例においては500トリチェリ）[Torr]である。）に達すると直ちに、希釈媒体を用いての逆洗浄段階が行なわれる。従って、操作圧力は最初の値にもどる。なお、段階的分離と逆洗浄は、それぞれ圧力調節法および容積調節法で置き換えることも可能である。

以下の実施例は、本発明の範囲を限定することなしにさらに該方法を説明するものである。この実施例は特に有用なガラス膜を用いて行なわれた。しかしながら、プラスチックのような他の物質で

作られた膜もまた使用可能である。

実施例 1

0.3%の脂肪を含む脱脂乳は異なる成分に分離された。57μmの肉厚で282μmの内径を持つ毛細管膜のフィルターが使われた。膜の細孔容積は0.6ml/gで好ましい細孔半径は12.4nmであった。処理された乳は第2図のHPLCクロマトグラムに示される組成物を持つ。コロイド状の高分子成分（68000ダルトン）が分離された後、第3図に示される分布が得られた。結果は以下の通りである。

| | | | |
|----|----|---------|-------|
| 通過 | mw | 68,800: | 6.8% |
| | | 45,000: | 18.8% |
| | | 29,000: | 53.5% |
| | | 20,000: | 71.4% |

濃縮段階に用いられた浸透物は第4図に示されるような次の量を持っていた。

| | | | |
|----|----|---------|-------|
| 通過 | mw | 68,800: | 79.2% |
| | | 45,000: | 85.4% |
| | | 29,000: | 93.5% |

20,000:94.7%

すべての分離段階が単一種の膜で行なわれたことは価値ある点である。分離効果における相違は、関係する物質の濃度の相違によってのみ違した。

実施例 2

皮膚筋炎の患者の血液が分画された。微粒子成分の分離、および1:20の希釈率（第1図で示された方法の概要の第Ⅱ段階により図解されたもの）としたのち、希釈された血漿は、次の分離のための第Ⅱ段階へ移され、次に第Ⅳ段階で濃縮された。

次の分布が個々の物質に基づいて得られた。

| 物 質 | 投 入 [mg/分] | 回 収 [mg/分] | 収 量 [%] |
|----------|---------------|---------------|------------|
| アルブミン | 66.94 | 45.12 | 67.4 |
| 免疫グロブリンG | 8.45 | 5.21 | 62 |
| 免疫グロブリンA | 1.17 | 0.46 | 39 |
| 免疫グロブリンM | 1.17 | * | 0 |

*微量のため計測不可能

実施例 3

I G A - 形質細胞腫の患者の血液が実施例 2 に従い処理された。希釈率は 1 : 14 であった。

| 物 質 | 投 入 [mg/分] | 回 収 [mg/分] | 収 量 [%] |
|---------------------------------|---------------|---------------|------------|
| α ₁ 抗トリプシン | 1.78 | 1.08 | 61 |
| アルブミン | 21.12 | 12.67 | 60 |
| トランスフェリン | 1.48 | 0.38 | 26 |
| 免疫グロブリン G | 1.42 | 0.45 | 53 |
| 免疫グロブリン A | 32.99 | 12.47 | 38 |
| カエルロプラジミン (caeruloplasmin) | 0.15 | * | 0 |
| 補体 C ₄ | 0.17 | 0.05 | 29 |
| 補体 C ₃ | 0.43 | 0.14 | 33 |
| 免疫グロブリン M | 0.13 | * | 0 |

* 微量のため計測不可能

処理の全時間にわたって計算された 60% のアルブミン回収率における 62% までの免疫グロブリンの還元は、先行技術の方法以上の本発明の方法の有利性を明らかに示すものである。

本発明の方法は、いかなる種類のタンパク質混

合物の分離にも適用できるものである。これは、最終生産物が酵素から、他の高分子物質からおよび微粒子成分から分離されるべき発酵汁の加工工程に使用可能である。例えば本方法による分離系は、直接的に酵素反応器に接続可能である。

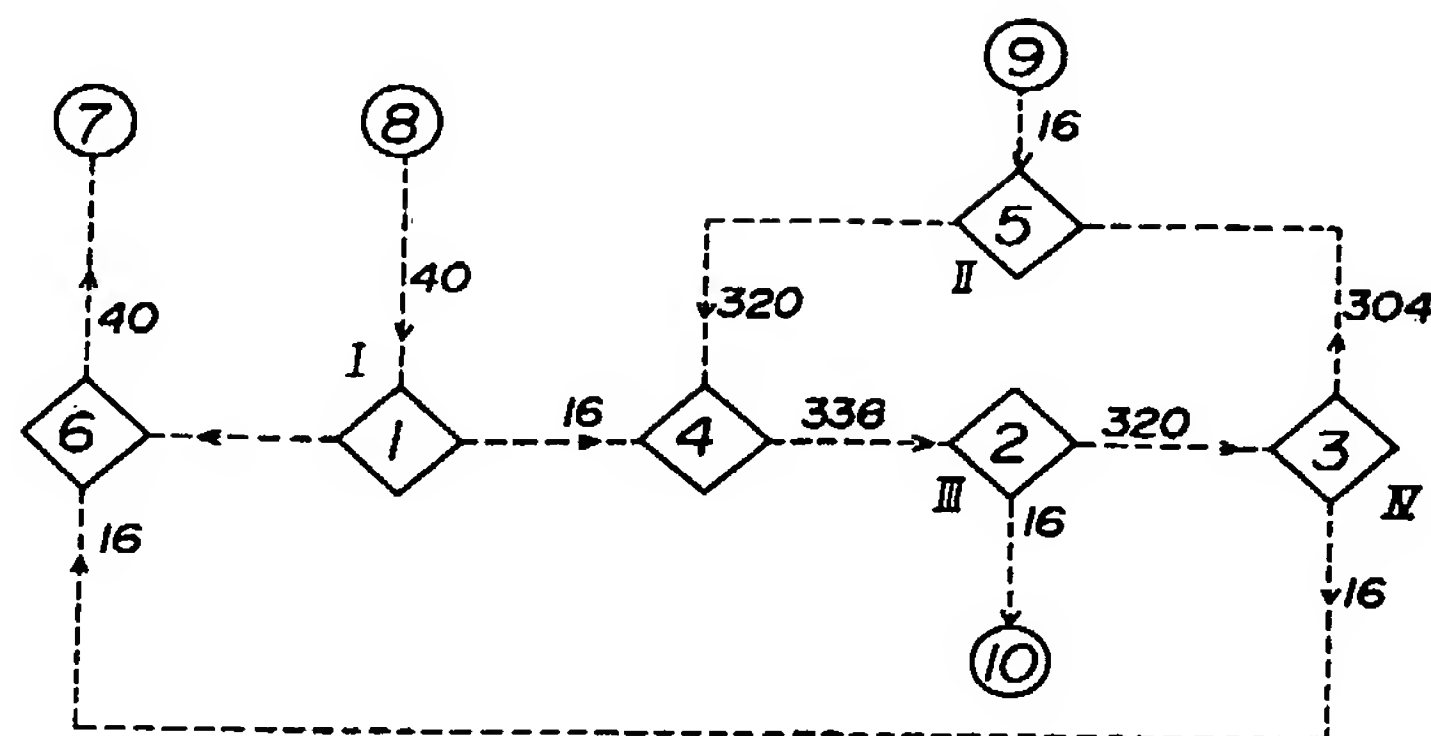
4. 図面の簡単な説明

第 1 図は膜カスケード濾過の物質平衡を含む概略ブロック線図であり、第 2 図は、0.3% の脂肪を含む脱脂乳の HPLC - クロマトグラムであり、第 3 図は乳の限外濾過液の HPLC - クロマトグラムであり、第 4 図は二度分離の乳の限外濾過液の HPLC - クロマトグラムである。

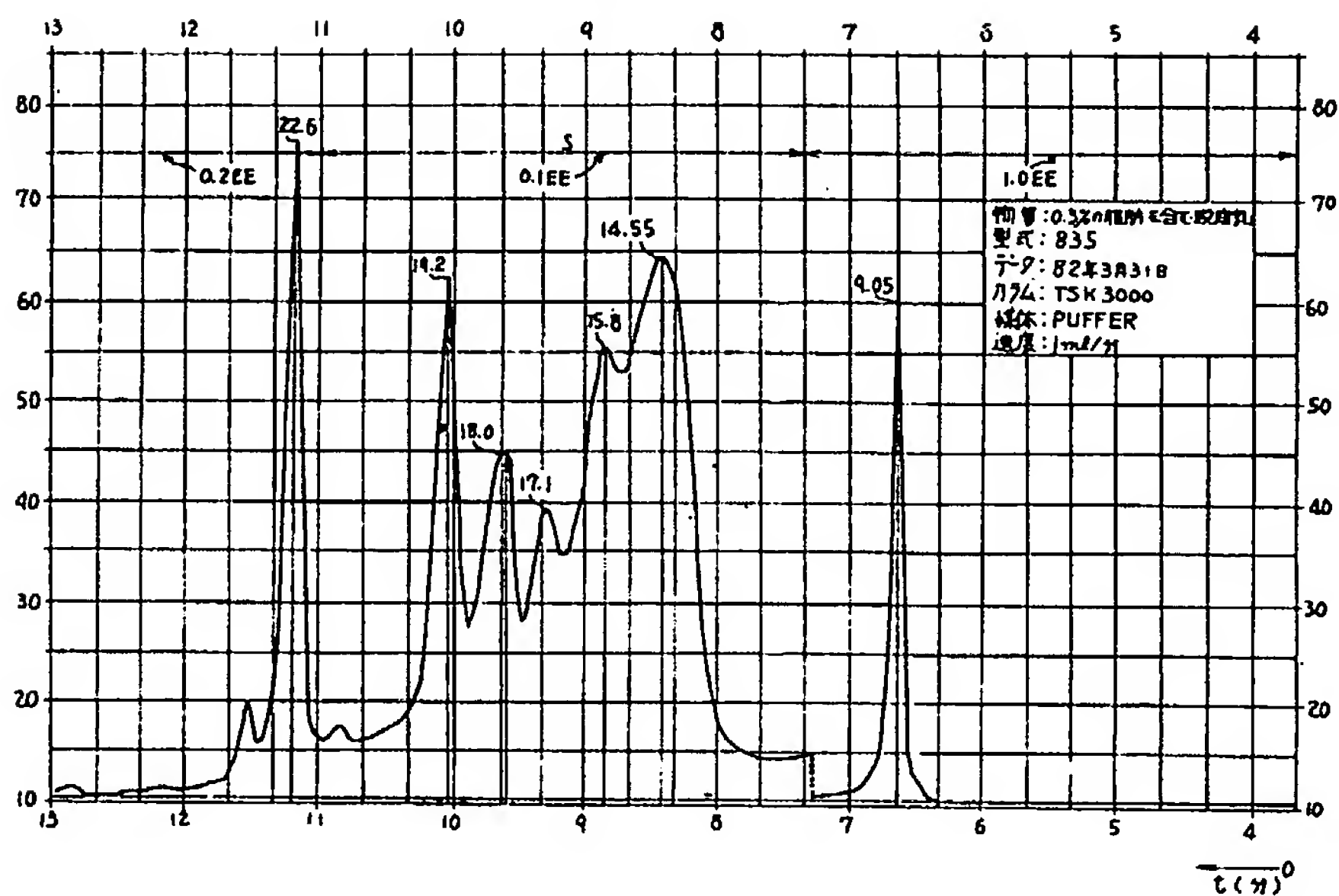
1 … 第 1 フィルター部、2 … 第 2 フィルター部、3 … 第 3 フィルター部、4 … 溶液希釈部、5 … 希釈媒体混合部、6 … 濃縮物混合部、7, 8 … 患者、9 … 希釈媒体注入部。

特許出願人 ショット グラスヴェルケ
代理人 弁理士 八 田 幹 雄

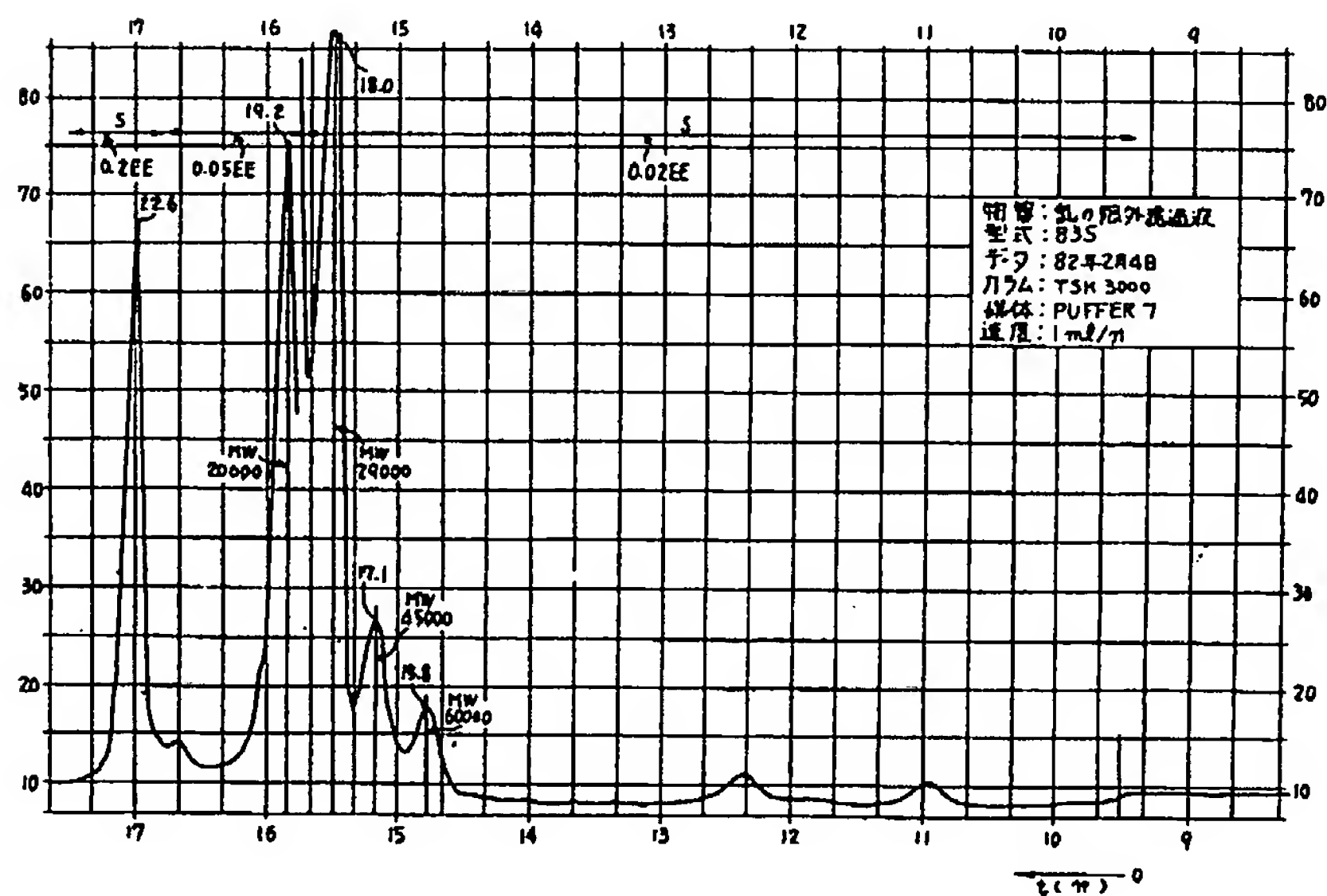
第 1 図



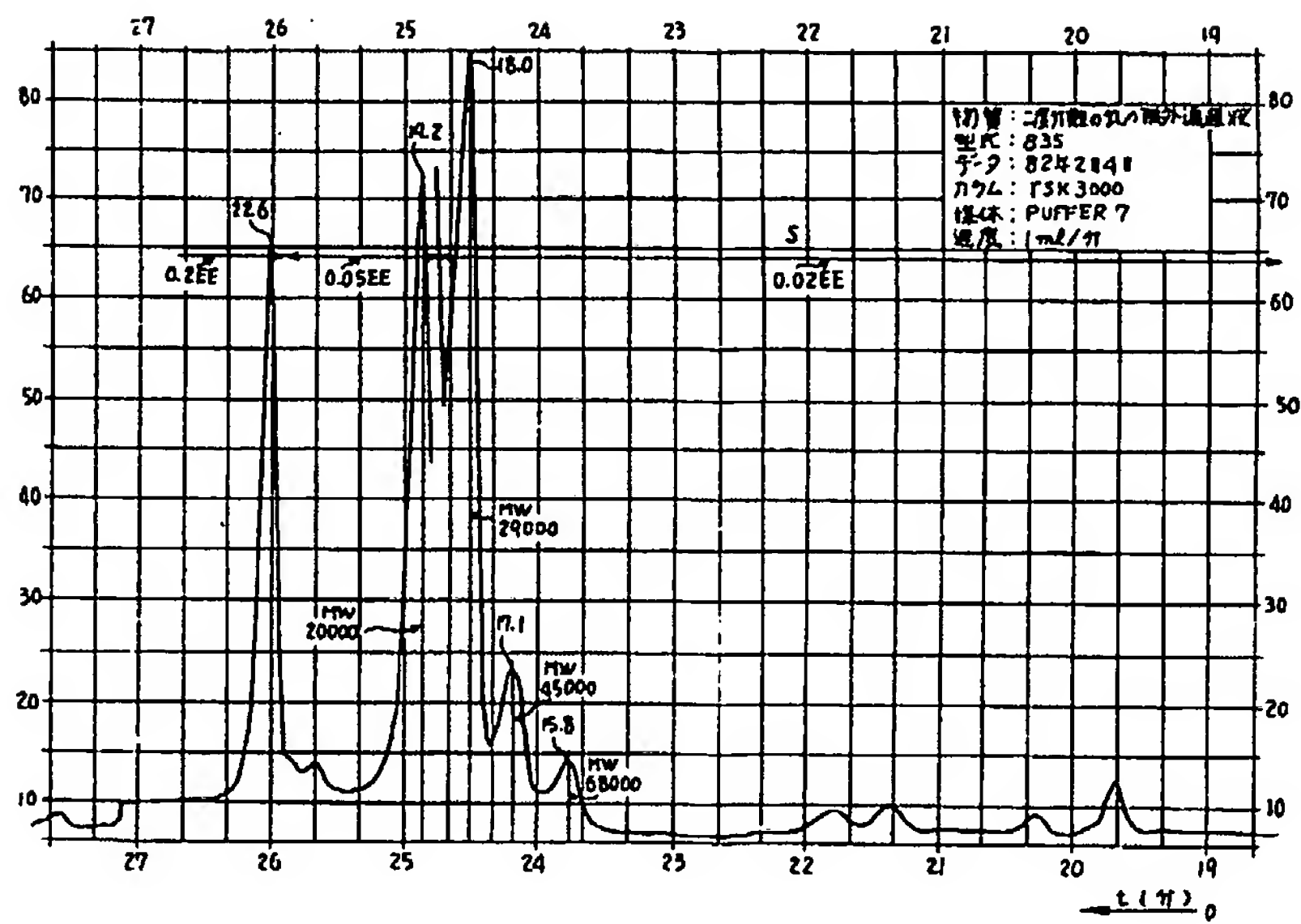
第 2 図



第 3 図



第 4 図



第 1 頁の続き

發明者

ハンス・フォン・バイエル

ドイツ連邦共和国1000ベルリン

19スパンダウア・ダム130